הגברת יעילות ניצול מים במנגנון חדש של בקרת סוכרים את מפתח הפיוניות

Enhancing water use efficiency via a newly discovered mechanism of sugar-mediated control of stomatal aperture

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

דוד גרנות המחלקה לחקר ירקות, מינהל המחקר החקלאי
מנחם מושליון הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית

David Granot *Dept. Vegetable research, The Volcani Center, ARO, P.O Box 6 Bet Dagan, 50250. E-Mail: granot@agri.gov.il*

Menachem Moshelion *The Institute of Plant Sciences and Genetics in Agriculture, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot 76100, Israel*

סיון תשע״ג יולי 2014

הממצאים בדו״ח זה הינם תוצאות ניסויים.
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר

David Granot

רשימת פרסומים:

Granot D, David-Schwartz R, Kelly G. 2013. Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development. *Front Plant Sci* **4**: 44, doi: 10.3389/fpls.2013.00044.
Granot D, Kelly G, Stein O, David-Schwartz R. 2014. Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. *J Exp Bot* **65**: 809-819.
Kelly G, David-Schwartz R, Sade N, Moshelion M, Levi A, Alchanatis V, Granot D. 2012. The pitfalls of transgenic selection and new roles of *AtHXK1*: a high level of *AtHXK1* expression uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from exogenous sugar. *Plant Physiol* **159**: 47-51.
Kelly G, Moshelion M, David-Schwartz R, Halperin O, Wallach R, Attia Z, Belausov E, Granot D. 2013. Hexokinase mediates stomatal closure. *Plant J* **75**: 977-988.

תקציר

הצגת הבעיה: המחסור במים הוא גורם מגביל עיקרי של מרבית הגידולים החקלאיים. רוב המים הנקלטים על ידי הצמח (למעלה מ- 98%) מתנדפים לאטמוספרה ורק חלק קטן (כ- 2%) משמשים לקיבוע פחמן. בניסוח אחר, על כל מולקולת CO_2 שמקובעת בתהליך הפוטוסינתזה הצמח מאבד כ- 50 מולקולות מים. יחס זה מכונה יעילות ניצול מים (WUE - water use efficiency). איבוד המים לאטמוספרה מתרחש ברובו המכריע דרך הפיוניות. קליטת CO_2 לצורך קיבוע פחמן במעגל קלווין מחייבת פתיחה של הפיוניות, וחשיפת החלל התת-פיוניתי אל האוויר. פועל יוצא של פתיחת הפיוניות הוא איבוד מים (דיות) מהחללים הבינתאיים במזופיל, דרך החלל התת-פיוניתי אל האטמוספרה. הפיוניות אם כן, הן "ברז" המים העיקרי של הצמח. ההכרח בפתיחתן גורם לבזבוז מים (הרבה מעבר לדרוש לצורך הולכת מינרלים מהשורש לנוף, או לקרור הנוף), והוא הבסיס ליעילות נמוכה של ניצול המים. מאחר שהמים הם הגורם המגביל העיקרי בחקלאות, מושקע מאמץ רב בחיפוש דרכים להגברת יעילות ניצול המים.

מטרות המחקר: מטרות המחקר הן לבחון את השפעת הקסוקינאז על התנהגות הפיוניות והצמח השלם בצמחי עגבניה וארבידופסיס.

שיטות העבודה: ייצור צמחים טרנסגניים בשיטות הרגילות ואנליזה של הצמחים בשיטות מולקולאריות מיקרוסקופיות ופיסיולוגיות. השיטות כוללות אנליזת ביטוי גנים, מדידת חילוף גזים, מדידת מפתח פיוניות ומעקב אחרי טרנספירציה של כל הצמח בעזרת ליזימטרים.

תוצאות עיקריות: ביטוי HXK גורם לעליה בביטוי של גנים ל- ABA וליצירת NO בתאי השמירה. הפרומוטור KST מקנה ביטוי ספציפי בפיוניות של צמחי עגבניה וארבידופסיס. ביטוי HXK בפיוניות בלבד (תחת KST) גורם לירידה משמעותית באידוי מים בצמחי ארבידופסיס ועגבניה. הירידה באידוי המים מתרחשת ללא פגיעה בפוטוסינתזה ובצימוח, כלומר יש הגברה של יעילות ניצול המים.

מסקנות והמלצות: לממן הכנסת הטכנולוגיה הזו לגידולי שדה חשובים כמו תירס חיטה וכותנה.

מבוא

מים הם הגורם המגביל העיקרי של צמחי יבשה בכלל וצמחי חקלאות בפרט, ולכן כל צמחי היבשה פיתחו מעטפת חיצונית אטומה שנועדה למנוע איבוד מים. אולם כדי לאפשר קליטת CO_2 מהאטמוספרה התפתחו בכל צמחי היבשה פתחים המאפשרים כניסת CO_2 לפוטוסינתזה. פתחים אלה קרויים פיוניות והם בנויים משני תאי שמירה (Guard cells). לתאי השמירה יש יכולת תנועה שגורמת לפתיחה וסגירה של הפיוניות. קליטת CO_2 לצורך קיבוע פחמן מחייבת פתיחה של הפיוניות, וחשיפת החלל התת-פיוניתי אל האוויר (Taiz and Zeiger, 1998). כשאין פוטוסינתזה ואין צורך בקליטת CO_2, כמו בלילה למשל, הפיוניות נסגרות כדי למנוע איבוד מים. פועל יוצא של פתיחת הפיוניות הוא איבוד מים (דיות) מהחללים הבינתאיים במזופיל, דרך החלל התת-פיוניתי אל האטמוספרה. רוב המים (למעלה מ- 95%) הנקלטים על ידי העץ מתאדים לאטמוספרה דרך הפיוניות כשהן נפתחות, ורק חלק קטן (פחות מ- 5%) משמש לצורך קיבוע פחמן וצימוח. יחס זה מכונה יעילות ניצול מים (WUE - water use efficiency) (Taiz and Zeiger, 1998). הפיוניות אם כן, הן "ברז" המים העיקרי של הצמח. ההכרח בפתיחתן גורם לבזבוז מים (הרבה מעבר לדרוש לצורך הולכת מינרלים מהשורש לנוף, או לקרור הנוף), והוא הסיבה העיקרית ליעילות הנמוכה של ניצול המים. מאחר שהמים הם הגורם המגביל העיקרי בחקלאות, מושקע מאמץ רב בחיפוש דרכים להגברת יעילות ניצול המים על ידי שליטה במפתח הפיוניות. מחקרים רבים הופנו להגברת

קצב קיבוע הפחמן אולם למיטב ידיעתנו ללא פריצת דרך משמעותית. לעומת זאת, יש דיווח על הצלחה חלקית בהפחתת נידוף המים על ידי שליטה במפתח הפיוניות בעזרת ייצור מוגבר של ABA – הורמון עקה הגורם לסגירת פיוניות – אולם עם תופעות לוואי לא רצויות של ההורמון ABA שעיקרן עיכוב צימוח (Thompson et al., 2007). האתגר הגדול הוא להגביר את יעילות ניצול המים על ידי הפחתה בנידוף המים ללא פגיעה בצימוח וביבול.

ברמה המכנית, הפיוניות נפתחות בתגובה לעליה בריכוז המומסים בתוך תאי השמירה שגורם לכניסת מים ולעליה בטורגור של תאי השמירה, להתנפחותם ולפתיחת הפיונית (Taiz and Zeiger, 1998). סגירת הפיונית מתרחשת בתהליך הפוך של יציאת מומסים ומים מתאי השמירה, ירידת נפח תאי השמירה וסגירת הפיונית. מאחר שצמחים תלויים בזמינות המים, ומפני שהפיוניות הן השולטות באיבוד המים, התפתחו במהלך האבולוציה מנגנונים מורכבים של בקרה על מפתח הפיוניות, אולם כולם פועלים דרך אותו מנגנון מכני של שינוי ריכוז המומסים בתאי השמירה הגורם לפתיחה וסגירה של הפיוניות. המנגנונים השולטים על שינוי ריכוז המומסים בתאי השמירה מגיבים לגורמים סביבתיים ואנדוגניים הכוללים אורכי גל ועוצמות אור, לחות, ריכוז CO_2, טמפ׳, יונים והורמונים (Assmann, 1993; Schroeder et al., 2001). ההיגיון האבולוציוני העומד בבסיס התגובה של הפיוניות הוא להיפתח כשתנאי הסביבה והמצב הפסיולוגי מאפשרים קיבוע פחמן, ולהסגר כשקיבוע הפחמן אינו דרוש או אינו יעיל, במטרה לחסוך במים.

לכאורה, בתנאים אופטימליים (שפע אור ושפע מים), הפיוניות יכולות להיפתח בתחילת היום ולהסגר בערבו. אולם ברור היום שמפתח הפיוניות הוא דינמי ומשתנה לא רק במהלך היום, אלא גם במרווחי זמן קצרים (שעות ואף דקות) (Lawson et al., 2010). כלומר מפתח הפיוניות (המכונה גם מוליכות הפיוניות) משתנה מספר פעמים במהלך היום בתגובה לשינויים בגורמים סביבתיים ואנדוגניים, כמו למשל עצמת האור, רמת הפוטוסינתזה והיכולת לאגור או לשנע את הסוכרים שנוצרים בפוטוסינתזה לאברי המבלע (Lawson et al., 2010). המנגנונים הדינמיים של הפיוניות התפתחו במהלך האבולוציה כדי למנוע איבוד מים ולהגביר את יעילות ניצול המים. אולם במהלך התירבות של צמחי חקלאות עיקר הסלקציה הייתה לטובת הגברת היבול תוך הזנחה של המנגנונים שנועדו למנוע איבוד מיותר של מים ועל כן מניחים שיעילות ניצול המים של צמחי חקלאות נמוכה אף יותר מזו של מיני הבר וניתנת לשיפור (Richards, 2000; Yoo et al., 2009).

לפני כמאה שנה, בתחילת המחקר על המנגנונים הגורמים לפתיחת פיוניות, הניחו שסוכרים דוגמת סוכרוז (שמקורם בפרוק עמילן בתאי השמירה בזמן הזריחה) הם האוסמוליטים העיקריים שגורמים לעליית הטורגור בתאי השמירה ולפתיחת הפיוניות בבוקר (Lloyd, 1908). היפותזה הזו תוקנה לפני כחמישים שנה עם הגילוי שיוני אשלגן יחד עם יוני כלור ומאלאט הם האוסמוליטים העיקריים שגורמים לפתיחת הפיוניות (Schroeder et al., 2001; Roelfsema and Hedrich, 2005; Pandey et al., 2007). אולם בנוסף ליונים אלה ממשיכים לטעון שהצטברות סוכרוז שמקורו בפרוק עמילן או בפוטוסינתזה בתאי השמירה, ו/או סוכרוז שמגיע מתאי המזופיל, תורמים גם הם לאוסמולריות של תאי השמירה ולפתיחה של הפיוניות (Gotow et al., 1988; Tallman and Zeiger, 1988; Poffenroth et al., 1992; Talbott and Zeiger, 1993, 1996). ההיפותזה העכשוית טוענת שיונים שונים שבמרכזם יוני אשלגן פותחים את

הפיוניות בבוקר ומוחלפים במהלך היום על ידי סוכרוז ששומר את הפיוניות פתוחות (Amodeo et al., 1996; Talbott and Zeiger, 1998; Schroeder et al., 2001; Lawson, 2009). ההיפותזה שסוכרוז תורם לפתיחת פיוניות ומחליף את יוני האשלגן במהלך היום, מבוססת על מדידות קורלטיביות בלבד בין ריכוז הסוכרוז בתאי השמירה ומפתח הפיוניות (Amodeo et al., 1996), תוך התעלמות מתוצאות ניסויים שאינם תומכים ואף עומדים בסתירה לקורלציה זו (Lu et al., 1995). כמעט לא נערכו ניסויים כדי לבדוק באופן ישיר השפעת סוכרים על מפתח פיוניות, למעט פירסום אחד שבו כן נבדקה ההשפעה של סוכרוז וסוכרים נוספים ונמצא שהם <u>סוגרים</u> פיוניות (Lee and Bowling, 1992). אולם ממצא זה נדחק לדיון של המאמר ללא ניסיון לבחון מחדש את ההיפותזה, ככל הנראה בגלל הדומיננטיות של הדעה הרווחת שסוכרים בכלל וסוכרוז בפרט פותחים פיוניות.

סוכרוז – דו סוכר המורכב מגלוקוז ופרוקטוז – מיוצר בעיקר בתאי המזופיל של הרבה מיני צמחים ומשם הוא מובל במערכת השיפה לכל חלקי הצמח. בהרבה מיני צמחים הסוכרוז המיוצר בתאי השיפה יוצא לאפופלסט - החלל הבין תאי – קודם שהוא מוטען לצינורות השיפה (Rennie and Turgeon, 2009). כתוצאה מכך, ריכוז הסוכרוז באפופלסט של העלה עולה במהלך היום עד לריכוז של 2mM (Kang et al., 2007). חלק מהסוכרוז המצוי באפופלסט נסחף עם זרם המים לכיוון הפיוניות ובעוד שהמים מתאדים לאטמוספרה, ריכוז הסוכרוז ליד תאי השמירה עולה ועשוי להגיע ל- 150 mM (Lu et al., 1995; Lu et al., 1997; Ewert et al., 2000; Outlaw and De Vlieghere-He, 2001; Kang et al., 2007). החוקרים שהראו שריכוז הסוכרוז ליד תאי השמירה עולה במהלך היום מציעים שהצטברות סוכרוז ליד הפיוניות מהווה סיגנל **אוסמוטי** לסגירתן. כלומר, כשיצור סוכרוז בתאי המזופיל עולה על יכולת ההטענה וההולכה של הסוכרוז בשיפה, חלק גדול יותר שלו נשטף עם זרם הטרנספירציה לכיוון הפיוניות ומהווה סיגנל אוסמוטי חוץ תאי שגורם לסגירה חלקית של הפיוניות, ובכך מקטין את הטרנספירציה ואת הפוטוסינתזה ומתאים אותם ליעילות הטרנסלוקציה (שינוע) של הסוכר (Outlaw, 2003; Kang et al., 2007). בדרך זו לדבריהם, הסוכרוז החוץ פיונייתי מהווה גורם מתאם בין רמת הפוטוסינתזה ובין הטרנספירציה. על אף זאת, רוב החוקרים עדיין מניחים שהסוכרוז נכנס לתאי השמירה ותורם גם לפתיחתם (Tallman and Zeiger, 1988; Ritte et al., 1999; Lawson, 2009).

מטבוליזם של סוכרוז מתחיל עם פרוקו. סוכרוז יכול להתפרק באפופלסט על ידי אינברטזות חוץ תאיות, או על ידי אינברטאזות תוך תאיות, לגלוקוז ופרוקטוז, או על ידי סוכרוז סינטאז תוך תאי (שבניגוד לשמו עיקר תפקידו בפרוק סוכרוז) לפרוקטוז ו- UDP-גלוקוז (Dennis and Blakeley, 2000). החד סוכרים (הקסוזות) גלוקוז ופרוקטוז המתקבלים מחיתוך הסוכרוז חייבים לעבור זירחון על ידי אנזימים מזרחני סוכרים. בצמחים ידועות רק שתי קבוצות של אנזימים שמזרחנים גלוקוז ופרוקטוז, הקסוקינאז (Hexokinase - HXK) ופרוקטוקינאז (Fructokinase - FRK) (Granot, 2007). האנזים HXK יכל לזרחן גלוקוז ופרוקטוז (עם אפיניות גבוהה בשני סדרי גודל לגלוקוז מלפרוקטוז) ואילו האנזים FRK מזרחן פרוקטוז בלבד (Granot, 2007). מחקרים רבים נעשו על האנזים HXK, ומלבד תפקידו הקטליטי כמזרחן הקסוזות הוא פועל כחיישן של סוכרים ומבקר למשל את תהליך הפוטוסינתזה (Rolland et al., 2006). **אולם אף לא אחד מהמחקרים בדק אפשרות שהקסוקינאז משפיע על <u>סגירת</u> פיוניות.**

מטרות המחקר

מטרת המחקר היתה לבחון האם ניתן להגביר את יעילות ניצול המים על ידי בקרה הדוקה של מפתח הפיונית.

המטרות הספציפיות של המחקר הן לבחון את השפעת הקסוקינאז המבוטא תחת פרומוטור ספציפי לפיוניות על התנהגות הפיוניות והצמח השלם בצמחי עגבניה וארבידופסיס.

פירוט עיקרי הניסויים

במהלך המחקר בחנו צמחי עגבניה המבטאים הקסוקינאז של ארבידופסיס (*AtHXK1*) ברמות שונות תחת הפרומוטור הגלובלי 35S. בעבר הראנו ש- HXK (*AtHXK1*) מבקר פוטוסינתזה וצימוח בעגבניה (Dai et al., 1999). כמו כן מצאנו שמפתח הפיוניות בצמחי העגבניה שיצרנו קטן ביחס ישר לרמות הביטוי של הקסוקינאז (איור 1a). בהתאם, מוליכות הפיוניות והטרנספירציה של צמחי העגבניה **ליחידת שטח עלה** ירדה עם העליה בביטוי של הקסוקינאז (איור 1b,c,d). תוצאות אלה כלולות במאמר השני של רשימת הפירסומים. כדי לבחון את ההשפעה של HXK על התנהגות פיוניות של ארבידופסיס יצרנו צמחי ארבידופסיס טרנסגניים שמבטאים HXK תחת 35S. מחקרים של קבוצות אחרות הראו ש- HXK מבקר פוטוסינתזה וצימוח של צמחי ארבידופסיס שמבטאים בעודף HXK, אולם רק בנוכחות גלוקוז בריכוז גבוה במצע הגידול (Jang et al., 1997; Moore et al., 2003). עקב כך, רוב הניסויים על ארבידופסיס ו- HXK היו מוגבלים לנבטים בלבד. מאחר שצמחי העגבניה שלנו הראו השפעות של HXK בתנאי גידול טבעיים ללא צורך בגלוקוז במצע, הנחנו שניתן ליצור צמחי ארבידופסיס דומים שיציגו השפעות של HXK ללא צורך בגלוקוז חיצוני. כמו כן שיערנו שקבוצות מחקר אחרות לא הצליחו לקבל צמחים כאלה בעבר

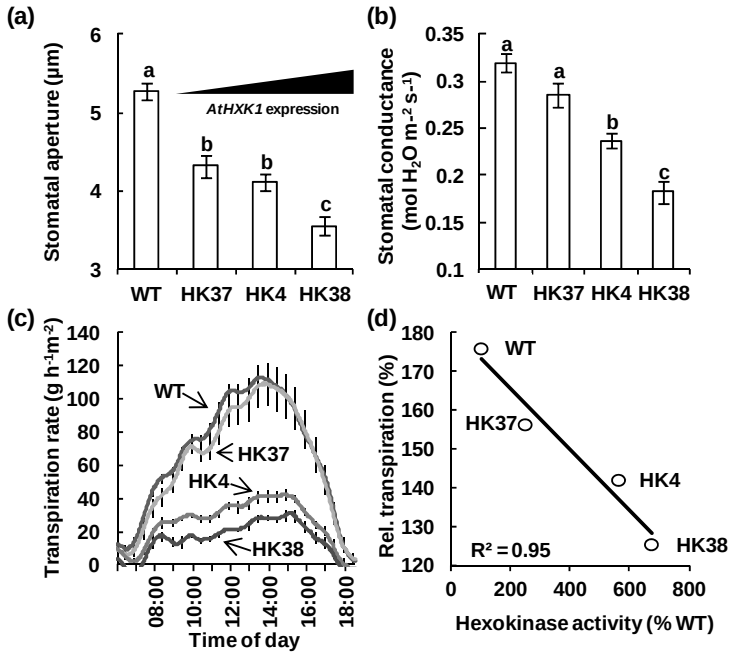


Figure 1. Elevated expression of HXK enhances stomatal closure and decreases transpiration. Stomatal aperture (a) and stomatal conductance (b) were determined for control (WT) and transgenic plants expressing different levels of *AtHXK1* (HK38 > HK4 > HK37) (Dai *et al.*, 1999). Aperture data are means of 200 stomata from four independent repeats ± SE. Stomatal conductance data are means of six independent repeats ± SE. Different letters indicate a significant difference (*t* test, $P < 0.05$). (c) The rate of transpiration normalized to the total leaf area was monitored simultaneously and continuously throughout the day and the data are given as the means ± SE for each 10th sampling point ($n = 6$). (d) A negative correlation was observed between whole-plant relative daily transpiration and relative hexokinase-phosphorylation activity. The transpiration data were normalized to the total leaf area and the amount of water taken up by the neighboring submerged fixed-size wick each day, which was set to 100%. WT hexokinase activity was set to 100%.

מפני ששיטת הסלקציה של צמחי ארבידופסיס טרנסגניים נוטה לבודד טרנסגנים חיוניים יותר על צלחות הסלקציה ולפספס טרנסגנים בעלי פנוטיפ של עיכוב צימוח. בהסתמך על השערה זו יצרנו מחדש צמחי ארבידופסיס טרנסגניים שמבטאים HXK תוך שימת דגש על קוים מעוכבים, ואכן הצלחנו לבודד קוים שהראו פנוטיפ בולט של עיכוב צימוח גם ללא נוכחות גלוקוז במצע. בעזרת הקוים החדשים שיצרנו בדקנו את השפעת HXK על צמחי ארבידופסיס בוגרים שגדלו באדמה בתנאי גידול רגילים. מצאנו שגם בארבידופסיס עליה בביטוי של HXK גורם לירידה במוליכות של הפיוניות ובטרנספירציה (Kelly et al., 2012). ממצאים אלה פורסמו במאמר הראשון ברשימת הפרסומים.

עדות ישירה לתפקיד של הקסוקינאז בבקרת פתיחת פיוניות השגנו בעזרת צמחי עגבניה וצמחי ארבידופסיס טרנסגניים שמבטאים את ההקסוקינאז באופן בלעדי בפיוניות. לשם כך השתמשנו בפרומוטור KST שמקורו בתפוח אדמה שמתבטא באופן בלעדי בפיוניות (Muller-Rober et al., 1995). כדי לבדוק האם פרומוטור זה אכן מתבטא באופן בלעדי בפיוניות גם בצמחי עגבניה וארבידופסיס יצרנו צמחים שמבטאים GFP (חלבון פלואורסצנטי) תחת KST ומצאנו שאכן לפרומוטור יש ביטוי ספציפי בפיוניות גם בצמחי עגבניה וארבידופסיס (איור 2).

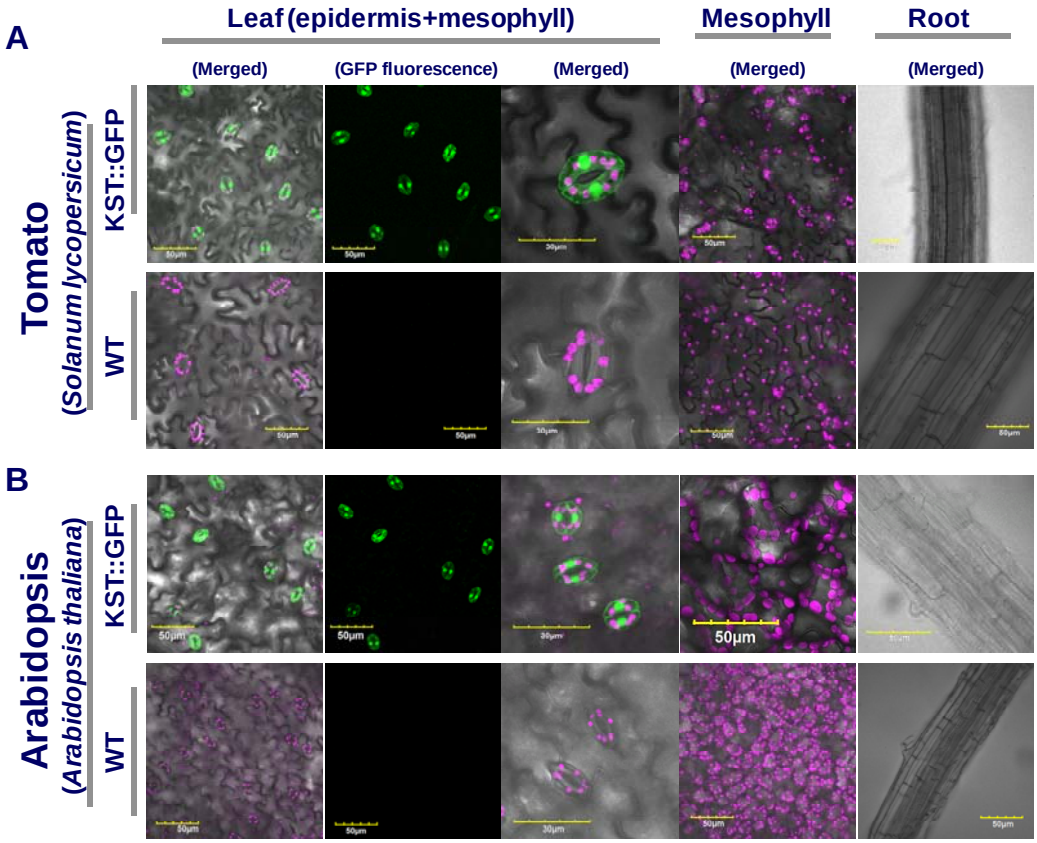


Figure 2. Specific expression of KST in guard cells of tomato and Arabidopsis plants. In both tomato and Arabidopsis plants, expression of the *KST* promoter (green color) was specific to guard cells and was not detected in other cell types or in organs that do not have stomata, such as roots. Green color – GFP; pink color - autofluorescence of mesophyll cells

בהמשך יצרנו צמחי עגבניה וארבידופסיס שמבטאים הקסוקינאז תחת KST. צמחים אלה היו בעלי מפתח פיוניות קטן יותר ואידו פחות כ- 20% מים במהלך היום (איור 3).

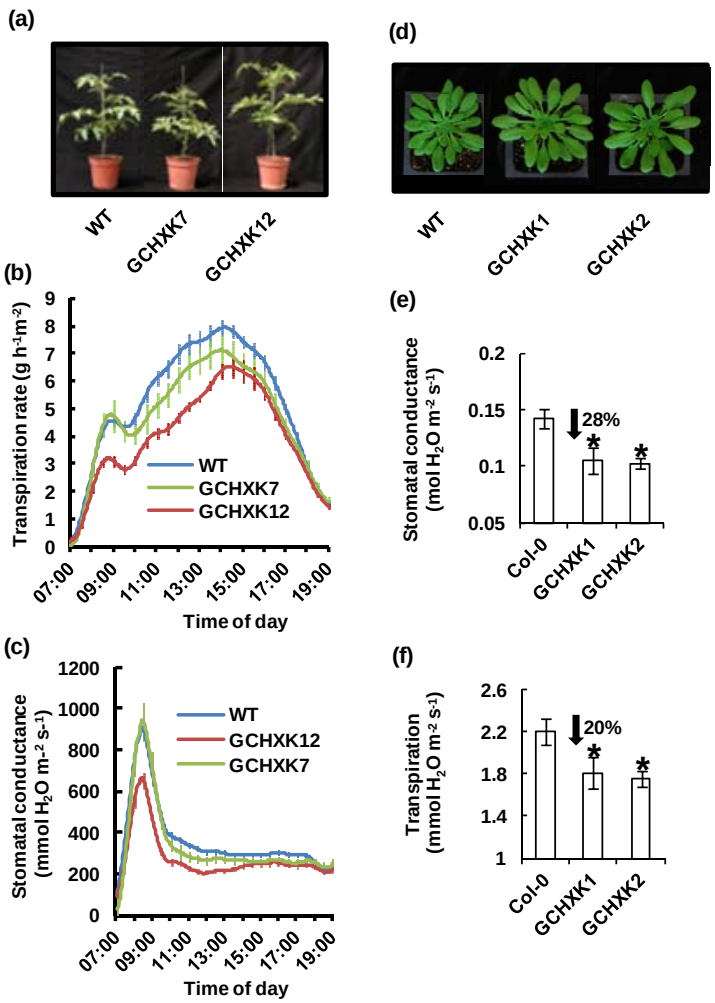


Figure 3: **Guard cell-specific expression of *AtHXK1* induces stomatal closure and reduces transpiration of tomato and Arabidopsis plants.** (a&d) Representative images of wild-type (WT) and independent transgenic tomato and Arabidopsis lines expressing *AtHXK1* specifically in guard cells (GCHXK7&12 and GCHXK1&2 respectively). The rates of tomato transpiration (b) and stomatal conductance (c) were monitored simultaneously and continuously throughout the day in wild-type plants (WT - blue line) and the two independent transgenic tomato lines expressing *AtHXK1* specifically in guard cells (GCHXK7 – green line and GCHXK12 – red line). Arabidopsis stomatal conductance and transpiration were measured using a portable gas-exchange system (LI-COR). Data points in b and c are given as means ± SE for each 10th sampling point (n = 12, 10 and 8 for WT, GCHXK12 and GCHXK7 respectively). When not seen, SE is smaller than the symbol. Data of the Arabidopsis plants are given as means (± SE) of 8 independent repeats. Asterisks denote significant differences relative to the WT (t test, P < 0.05). Arrows indicate decreased conductance and transpiration relative to the WT.

אולם הממצא העיקרי היה שבשונה מצמחים בהם ביטאנו את HXK בכלל הצמח תחת 35S (Dai et al., 1999; Kelly et al., 2012), ביטוי HXK בפיוניות בלבד לא פגע כלל בצימוח (איור 3) ובפוטוסינתזה (איור 4) של צמחי עגבניה. אדרבא, במספר קוים בלתי תלויים ניכר צימוח מוגבר (איור 5). כמו כן היתה עלייה ביעילות ניצול המים (איורים 4 ו- 5).

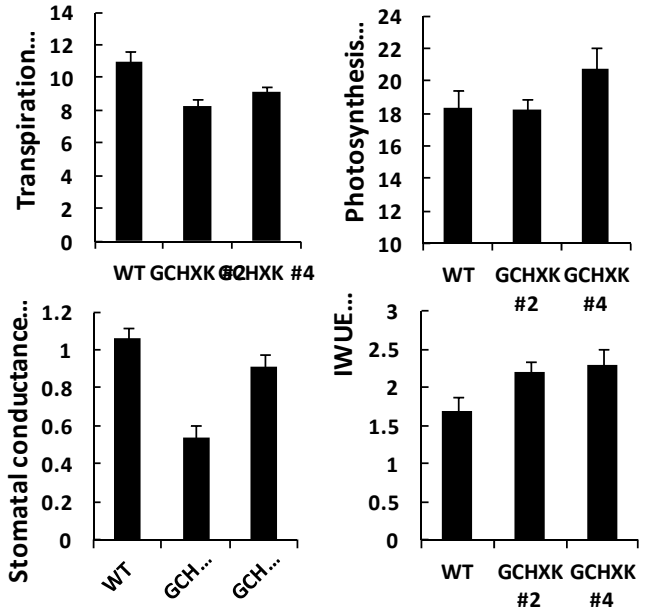


Figure 4. Guard cell specific expression of HXK in tomato plants reduces transpiration with no negative effect on photosynthesis. Two independent lines of tomato plants with guard cells specific expression of HXK (GCHXK lines) were analyzed using a portable gas-exchange system (LI-COR). Instantaneous water use efficiency (IWUE) was calculate as the ratio between photosynthesis and transpiration. 10 plants of each line were analyzed.

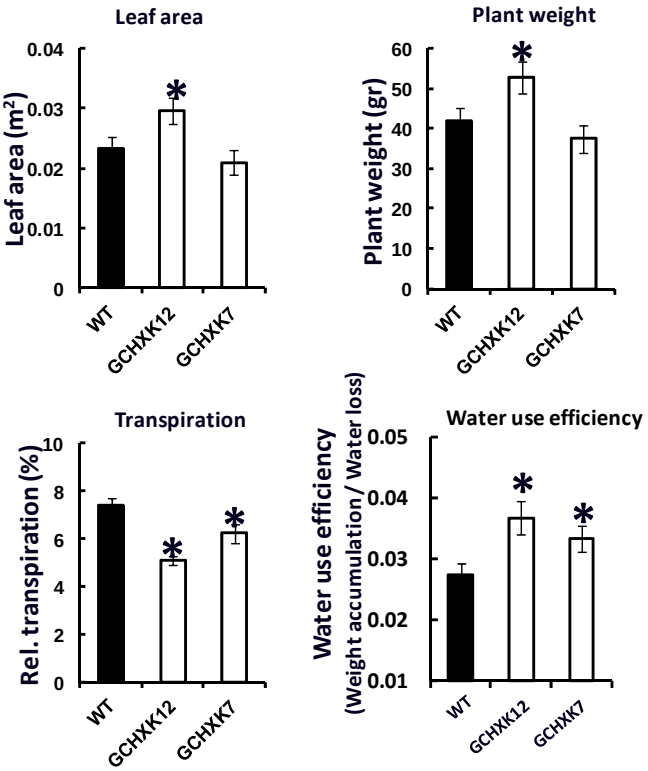
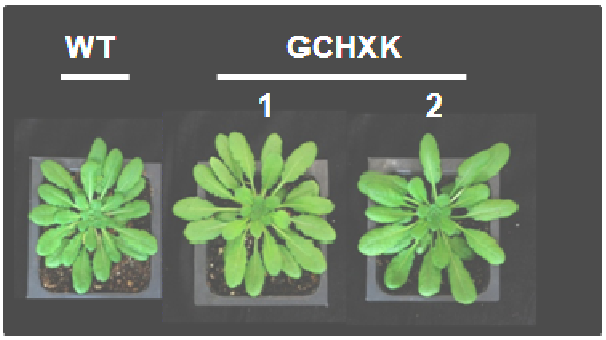


Figure 5. Effect of guard cell specific expression of HXK in tomato plants on leaf area, plant weight, transpiration and WUE. Two independent lines of tomato plants with guard cells specific expression of HXK (GCHXK lines) were analyzed. Transpiration was measured using lysimeter scales and water use efficiency was calculated by weight accumulation per water loss.

גם בצמחי ארבידופסיס שמבטאים הקסוקינאז בתאי השמירה בלבד (תחת KST) היתה ירידה בטרנספירציה ללא שום פגיעה בצימוח ובפוטוסינתזה, ובהתאם היתה עליה ביעילות ניצול המים (איור 6).



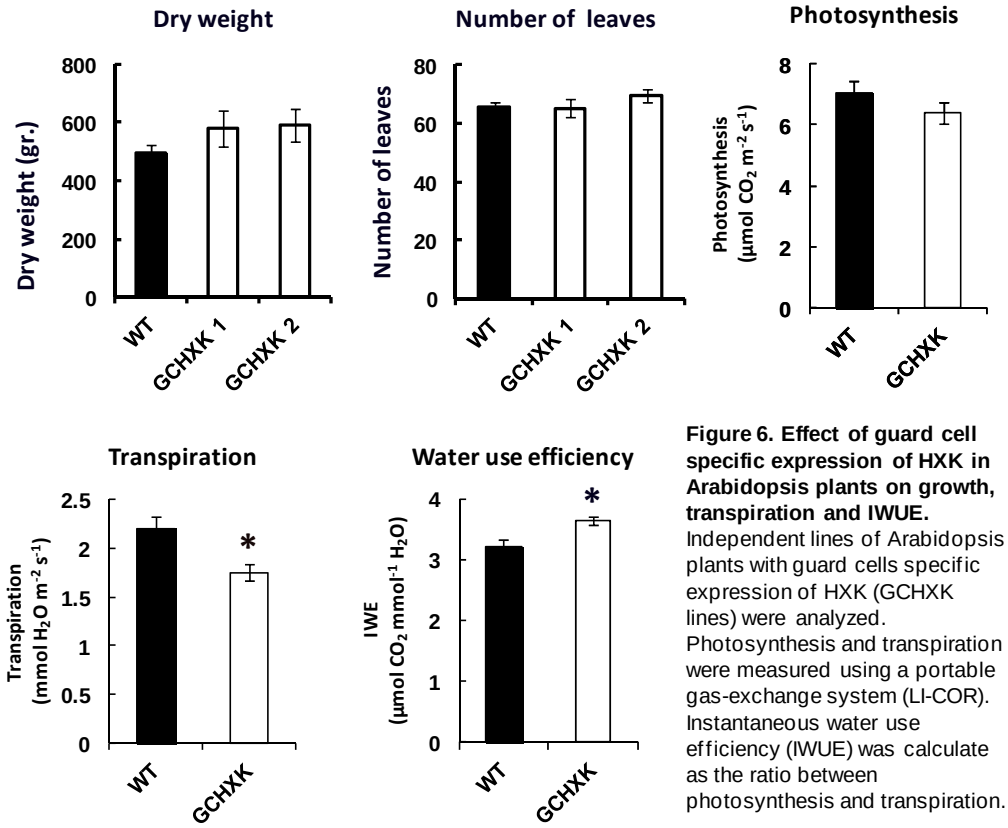


Figure 6. Effect of guard cell specific expression of HXK in Arabidopsis plants on growth, transpiration and IWUE. Independent lines of Arabidopsis plants with guard cells specific expression of HXK (GCHXK lines) were analyzed. Photosynthesis and transpiration were measured using a portable gas-exchange system (LI-COR). Instantaneous water use efficiency (IWUE) was calculate as the ratio between photosynthesis and transpiration.

בעבר הראו קשר בין HXK ובין הורמון העקה הצמחי ABA (Arenas-Huertero et al., 2000; Leon and Sheen, 2003; Rolland et al., 2006; Rognoni et al., 2007), אולם לא נעשה כל ניסיון לקשר בין הקסוקינאז ובין העובדה ש- ABA סוגר פיוניות. בעקבות ממצאנו ש- HXK סוגר פיוניות, הנחנו שההורמון ABA עשוי להיות מעורב בתהליך. מצאנו שיש עליה בביטוי גנים לייצור ABA בצמחים שמבטאים HXK (Kelly et al., 2012) ושסוכרוז גורם לייצור מוגבר של NO (Nitric oxide) בתאי השמירה (איור 7) (NO הוא חלק ממנגנון הסגירה של פיוניות בתגובה ל- ABA (Garcia-Mata et al., 2003; Neill et al., 2008). מצאנו גם שהעליה בייצור NO בתאי השמירה בתגובה לסוכר נעשית דרך HXK (Kelly et al., 2013). ממצאים אלה, המראים שסוכרוז אפופלסטי מבקר מפתח פיוניות דרך הקסוקינאז, ABA ו- NO, שופכים אור חדש לחלוטין על המנגנון בו סוכרים והקסוקינאז מבקרים פוטוסינתזה וצימוח. על פי היפותזת המחקר והממצאים שלנו, הקסוקינאז בפיוניות הוא החיישן המאזן בין קצב הפוטוסינתזה ויעילות השינוע והניצול של הסוכרים ובין מפתח הפיוניות והטרנספירציה. כשהפוטוסינתזה עולה על יכולת ניצול הסוכרים, ריכוזם באפופלסט עולה, יותר סוכר נסחף לכיוון הפיוניות וגורם לסגירתן דרך HXK.

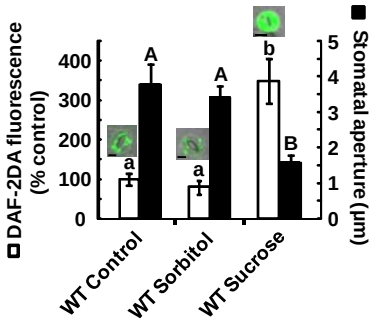


Figure 7: Sucrose stimulates NO production in guard cells. Nitric oxide (NO) levels were monitored in guard cells from epidermal peels of wild-type (WT) plants using the fluorescent NO indicator dye DAF-2DA. Relative fluorescence levels of guard cells (white bars) and stomatal apertures (black bars) were determined after 30 min of treatment with MES buffer (control) or MES containing either 100 mM Suc or 100 mM sorbitol as an osmotic control. Representative fluorescence images are shown above the fluorescence columns (bar = 10 µm). Data are given as means ± SE of 90 stomata for each treatment with three to four independent biological repeats of each treatment.

דיון

על סמך ממצאנו בצמחי עגבניה וארבידופסיס, אנו מניחים שהמנגנון בו סוכרים מבקרים את מפתח הפיוניות ומווסתים את הטרנספירציה הוא אוניברסאלי, ולכל הפחות מתקיים במינים בהם הטענת הסוכרים היא אפופלסטית (רוב צמחי החקלאות), כמו עגבניות וארבידופסיס. על פי ממצאנו נראה שניתן להגביר בעזרת המנגנון שחשפנו את התאום בין הפוטוסינתזה והטרנספירציה וכך למנוע איבוד מיותר של מים ולהגדיל את יעילות ניצול המים. הנקודה המרכזית בפיתוח שלנו היא הגברת הרגישות ומהירות התגובה של הפיוניות על ידי ביטוי מוגבר של האנזים הקסוקינאז בפיוניות.

ביטוי מוגבר של הקסוקינאז בפיוניות אינו גורם לשום תופעות לוואי שליליות מפני שהקסוקינאז כשלעצמו אינו סוגר פיוניות והוא פועל רק כחיישן של רמות הסוכרים באפופלסט שליד הפיוניות. הגברת הביטוי של HXK בפיוניות מגבירה את הרגישות של תאי השמירה לנוכחות הסוכר וגורמת להן להגיב (להסגר) מהר יותר וכך מובילה לחיסכון במים (של כ- 20% במקרה של עגבניות וארבידופסיס) ללא כל פגיעה בפוטוסינתזה ובצימוח.

References

Amodeo G, Talbott LD, Zeiger E (1996) Use of potassium and sucrose by onion guard cells during a daily cycle of osmoregulation. Plant and Cell Physiology **37:** 575-579

Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, Leon P (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. Genes & development **14:** 2085-2096

Assmann SM (1993) Signal transduction in guard cells. Annu Rev Cell Biol **9**345-375 :

Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner K, Levine A, Granot D (1999) Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. Plant Cell **11:** 1253-1266

Dennis DT, Blakeley SD (2000) Carbohydrate Metabolism. *In* BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones, eds, Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA, pp 676–728

Ewert M, Outlaw W, Zhang S, Aghoram K, Riddle K (2000) Accumulation of an apoplastic solute in the guard-cell wall is sufficient to exert a significant effect on transpiration in *Vicia faba* leaflets. Plant Cell and Environment **23:** 195-203

Garcia-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L ,**Blatt MR** (2003) Nitric oxide regulates K+ and Cl- channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. Proc Natl Acad Sci U S A **100:** 11116-11121

Gotow K, Taylor S, Zeiger E (1988) Photosynthetic carbon fixation in guard cell protoplasts of *Vicia faba* L. : evidence from radiolabel experiments. Plant Physiol **86:** 700-705

Granot D (2007) Role of tomato hexose kinases. Functional Plant Biology **34:** 564-570

Jang JC, Leon P, Zhou L, Sheen J (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. The Plant cell **9:** 5-19

Kang Y, Outlaw WH, Jr., Andersen PC, Fiore GB (2007) Guard-cell apoplastic sucrose concentration - a link between leaf photosynthesis and stomatal aperture size in the apoplastic phloem loader Vicia faba L. Plant Cell Environ **30:** 551-558

Kelly G, David-Schwartz R, Sade N, Moshelion M, Levi A, Alchanatis V, Granot D (2012) The pitfalls of transgenic selection and new roles of AtHXK1: a high level of AtHXK1 expression uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from exogenous sugar. Plant Physiol **159:** 47-51

Kelly G, Moshelion M, David-Schwartz R, Halperin O, Wallach R, Attia Z, Belausov E, Granot D. 2013. Hexokinase mediates stomatal closure. Plant J **75**: 977-988

Lawson T (2009) Guard cell photosynthesis and stomatal function. New Phytol **181:** 13-34

Lawson T, Caemmerer Sv, Baroli I (2010) Photosynthesis and stomatal behaviour. *In* U Lüttge, W Beyschlag, B Büdel, D Francis, eds, Progress in Botany, Vol 72. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

Lee J, Bowling DJF (1992) Effect of the mesophyll on stomatal opening in *Commelina communis*. Journal of Experimental Botany **43:** 951-957

Leon P, Sheen J (2003) Sugar and hormone connections .Trends Plant Sci **8:** 110-116.

Lloyd FE (1908) The physiology of stomata. Carnegie Inst Washington Year Book **82:** 1-142

Lu P, Outlaw WH, Smith BG, Freed GA (1997) A new mechanism for the regulation of stomatal aperture size in intact leaves - Accumulation of mesophyll-derived sucrose in the guard-cell wall of Vicia faba. Plant Physiology **114:** 109-118

Lu P, Zhang SQ, Outlaw WH, Jr., Riddle KA (1995) Sucrose: a solute that accumulates in the guard-cell apoplast and guard-cell symplast of open stomata. FEBS Lett **362:** 180-184

Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J (2003) Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. Science **300:** 332-336

Muller-Rober B, Ellenberg J, Provart N, Willmitzer L, Busch H, Becker D, Dietrich P, Hoth S, Hedrich R (1995) Cloning and electrophysiological analysis of KST1, an inward rectifying K+ channel expressed in potato guard cells. Embo J **14:** 2409-2416

Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J ,Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. J Exp Bot **59:** 165-176

Outlaw WH (2003) Integration of cellular and physiological functions of guard cells. Critical Reviews in Plant Sciences **22:** 503-529

Outlaw WH, Jr., De Vlieghere-He X (2001) Transpiration rate. An important factor controlling the sucrose content of the guard cell apoplast of broad bean. Plant Physiol **126:** 1716-1724

Pandey S, Zhang W, Assmann SM (2007) Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. FEBS Lett **581:** 2325-2336

Poffenroth M, Green DB, Tallman G (1992) Sugar Concentrations in guard cells of *Vicia faba* Illuminated with red or blue light : analysis by high performance liquid chromatography. Plant Physiol **98:** 1460-1471

Rennie EA, Turgeon R (2009) A comprehensive picture of phloem loading strategies. Proc Natl Acad Sci U S A **106:** 14162-14167

Richards RA (2000) Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. Journal of Experimental Botany **51:** 447-458

Ritte G, Rosenfeld J, Rohrig K, Raschke K (1999) Rates of sugar uptake by guard cell protoplasts of *pisum sativum* L. Related To the solute requirement for stomatal opening. Plant Physiol **121:** 647-656

Roelfsema MR, Hedrich R (2005 (In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. New Phytol **167:** 665-691

Rognoni S, Teng S, Arru L, Smeekens SCM, Perata P (2007) Sugar effects on early seedling development in Arabidopsis. Plant Growth Regulation **52:** 217-228

Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Annu Rev Plant Biol **57:** 675-709

Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D (2001) Guard Cell Signal Transduction. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **52:** 627-658

Taiz L, Zeiger E (1998) Plant Physiology (second edition). Sinauer Associates, Inc., Sunderland

Talbott LD, Zeiger E (1993) Sugar and Organic Acid Accumulation in Guard Cells of Vicia faba in Response to Red and Blue Light. Plant Physiol **102:** 1163-1169

Talbott LD, Zeiger E (1996) Central roles for potassium and sucrose in guard-cell osmoregulation. Plant Physiol **111:** 1051-1057

Talbott LD, Zeiger E (1998) The role of sucrose in guard cell osmoregulation .Journal of Experimental Botany **49:** 329-337

Tallman G, Zeiger E (1988) Light Quality and Osmoregulation in Vicia Guard Cells : Evidence for Involvement of Three Metabolic Pathways. Plant Physiol **88:** 887-895

Thompson AJ, Andrews J, Mulholland BJ, McKee JM ,Hilton HW, Horridge JS, Farquhar GD, Smeeton RC, Smillie IR, Black CR, Taylor IB (2007) Overproduction of abscisic Acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. Plant Physiol **143:** 1905-1917

Wilkinson S, Davies WJ (1997) Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. Plant Physiol **113:** 559-573

Yoo C, Pence H ,Hasegawa P, Mickelbart M (2009) Regulation of Transpiration to Improve Crop Water Use. Critical Reviews In Plant Sciences **28:** 410-431

סיכום

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
מטרות המחקר היו לבחון את השפעת הקסוקינאז על התנהגות הפיוניות והצמח השלם בצמחי עגבניה וארבידופסיס.

עיקרי הניסויים והתוצאות.
נערכו ניסויים לבדיקת השפעת הקסוקינאז על מפתח פיוניות, צימוח, פוטוסינתזה, ייצור NO וביטוי גנים הקשורים ל- ABA בצמחים טרנסגניים המבטאים HXK. מתוצאות הניסוים נראה שאכן ביטוי של הקסוקינאז גורם לסגירת פיוניות דרך ABA ו- NO. ביטוי HXK תחת פרומוטור של פיוניות גורם לאידוי מופחת של מים ללא פגיעה בפוטוסינתזה, כלומר להגברת יעילות ניצול המים בצמחי עגבנייה וארבידופסיס.

מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?

מטרות המחקר הושגו כמעט במלואן. להערכתנו ניתן יהיה ליישם את הטכנולוגיה שנבחנת במחקר זה בהרבה מאוד גידולים חקלאיים.

בעיות שנותרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר?

הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח:

פרסומים בכתב –

Granot D, David-Schwartz R, Kelly G. 2013. Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development. *Front Plant Sci* **4**: 44, doi: 10.3389/fpls.2013.00044.

Granot D, Kelly G, Stein O, David-Schwartz R. 2014. Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. *J Exp Bot* **65**: 809-819.

Kelly G, David-Schwartz R, Sade N, Moshelion M, Levi A, Alchanatis V, Granot D. 2012. The pitfalls of transgenic selection and new roles of *AtHXK1*: a high level of *AtHXK1* expression uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from exogenous sugar. *Plant Physiol* **159**: 47-51.

Kelly G, Moshelion M, David-Schwartz R, Halperin O, Wallach R, Attia Z, Belausov E, Granot D. 2013. Hexokinase mediates stomatal closure. *Plant J* **75**: 977-988.

פטנטים - נרשם פטנט והוגש PCT.

הרצאות וימי עיון – הממצאים הוצגו במסגרת הכינוס על משבר המזון בעולם, וולקני, ישראל 2012

ובכינוס GORDON:

CO2 Assimilation in Plants: Genome to Biome
New Hampshire, USA 2014

פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)

ניתן לפרסם דו"ח זה.